

BEST AVAILABLE COPY**Membrane and method for the separation of protein-bound substances from a protein-containing liquid by dialysis.****Publication number:** JP7506765T**Publication date:** 1995-07-27**Inventor:****Applicant:****Classification:**

- international: A61M1/14; A61M1/16; B01D61/24; B01D69/02;
B01D69/14; A61M1/34; A61M1/14; A61M1/16;
B01D61/24; B01D69/00; A61M1/34; (IPC1-7):
B01D69/02; A61M1/14; A61M1/16; B01D61/24

- european: A61M1/16D; A61M1/16R2; B01D61/24; B01D69/02;
B01D69/14B

Application number: JP19940520382T 19940317

Priority number(s): DE19934309410 19930319; WO1994IB00073
19940317; US19950570816 19951212

Also published as:

EP0615780 (A1)
WO9421363 (A1)
DE4309410 (A1)
EP0615780 (B1)

Report a data error here

Abstract not available for JP7506765T

Abstract of corresponding document: **EP0615780**

The present invention relates to a method for the separation of protein-bound substances (PBS) and, if present, water-soluble substances from a protein-containing liquid (A), e.g. blood or plasma, containing said substances, by dialysis using a special semipermeable membrane and a dialysate liquid (B) by means of a protein having an acceptor function for the PBS from liquid (A). The membrane useful for this method has to provide a tunnel-like porous structure on the liquid (A) side and a port- and adsorption-structure on the dialysate liquid (B) side. One or both sides of the membrane, i.e. the protein-containing liquid (A) side and the dialysate liquid (B) side of the membrane, are coated with a protein having an acceptor function the PBS. The PBS-containing dialysate liquid (B) obtained after dialysis may then be purified by passing it through a conventional dialyzer in order to remove water-soluble substances and then through a charcoal- and a resin-adsorbent in order to remove PBS from the acceptor protein molecules. The purified dialysate liquid (B) obtained containing the free acceptor protein molecules is then used again as dialysate liquid (B).

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(51)Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I
B 0 1 D 69/02		9153-4D	
A 6 1 M 1/14	5 2 3	9052-4C	
1/16	5 0 0	9052-4C	
B 0 1 D 61/24		9153-4D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 15 頁)

(21)出願番号 特願平6-520382
 (86)(22)出願日 平成6年(1994)3月17日
 (85)翻訳文提出日 平成6年(1994)9月26日
 (86)国際出願番号 P C T / I B 9 4 / 0 0 0 7 3
 (87)国際公開番号 W O 9 4 / 2 1 3 6 3
 (87)国際公開日 平成6年(1994)9月29日
 (31)優先権主張番号 P 4 3 0 9 4 1 0 . 4
 (32)優先日 1993年3月19日
 (33)優先権主張国 ドイツ (DE)
 (81)指定国 J P

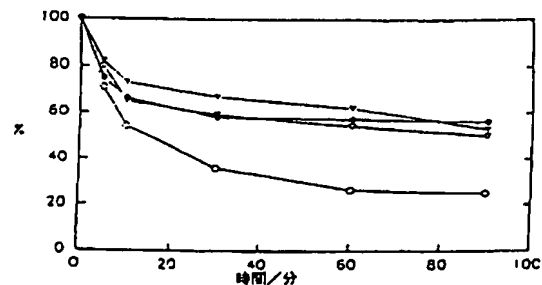
(71)出願人 スタンゲ, ヤン
 ドイツ連邦共和国ディ - 18055 ロス
 トック, ダブリュ. ゼーレンビンデルシュ
 トラーセ 38
 (71)出願人 ミッツナー, ステフェン
 ドイツ連邦共和国ディ - 18055 ロス
 トック, ヴェンデンシュトラーセ 2
 (71)出願人 ラムロウ, ヴォルフガング
 ドイツ連邦共和国ディ - 18209 パッ
 ト, ドベラン, ゲーテシュトラーセ 20
 (74)代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 蛋白質含有液から蛋白質-結合物質を透析により分離する膜と方法

(57)【要約】

本発明は蛋白質-結合物質 (P B S)、及び存在するならば水溶性物質を含有する蛋白質-含有液 (A)、例えば血液又は血漿からそれら物質を特別の半透膜と、透析液 (B) を使用する透析で、液 (A) からの P B S に対して受容体機能を有する蛋白質により分離する方法に関する。この方法に有用な膜は液 (A) 側にはトンネル-様構造を与え、透析液 (B) 側には出入-及び吸着-構造を与えなければならない。膜の1つの面又は両面、即ち膜の蛋白質-含有液 (A) 側と透析液 (B) 側は P B S に対して受容体機能を有する蛋白質で被覆されている。透析後に得られる P B S-含有透析液 (B) は、次に、水溶性物質を除去するためにその透析液を常用の透析装置に、次いで受容体の蛋白質分子から P B S を除去するために木炭及び樹脂吸着材に通し、通過させることによって精製することができる。得られた、遊離の受容体蛋白質分子を含有する精製された透析液 (B) は次に再び透析液 (B) として再度使用される。



請求の範囲

1. 蛋白質-結合物質をこれら物質を含有している蛋白質-含有液(A)から、透析液(B)に対する透析により分離するための膜にして、該蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質が膜の少なくとも1つの面に結合されており、該膜は該蛋白質-結合物質が膜を通過できるような孔寸法を有している、膜装置。
2. 膜の少なくとも2つの部分(領域)を含み、一方の部分は、蛋白質-結合物質は通過させるが、蛋白質-含有液(A)中の蛋白質-結合物質を結合した蛋白質(膜)と透析液(B)中の受容体蛋白質は排除する実効分離機能を有する部分であり、他方の部分は出入-及び吸着-機能を有する部分である、少なくとも1つの面が蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質で被覆されている、請求の範囲第1項に記載の膜。
3. 蛋白質-含有液(A)の側にトンネル-様構造を持つ、実効分離機能を有する1つの部分と透析液(B)の側に出入-及び吸着-構造を持つ部分を含み、該トンネルは約10 μ m未満の長さ、蛋白質-含有液(A)中の蛋白質と透析液(B)中の受容体蛋白質を排除すべく十分に小さい直径を有するものである、請求の範囲第1項又は第2項に記載の膜。
4. トンネルの長さが約5 μ m未満である、請求の範囲第1〜3項のいずれかに記載の膜。
5. トンネルの長さが約0.1 μ m未満である、請求の範囲第1〜3項のいずれかに記載の膜。
6. 膜の材料がポリスルホン系、ポリアミド系、ポリカーボネート系、ポリエステル系、アクリロニトリル重合体系、ビニルアルコール重合体系、アクリレート重合体系、メタクリレート重合体系及び酢酸セルロース重合体系より成る群から選択されたものである、請求の範囲第1〜3項のいずれかに記載の膜。
7. 膜の材料がポリスルホンである、請求の範囲第1〜3項のいずれかに記載の膜。
8. 膜の材料がポリスルホンである、請求の範囲第1項又は第2項に記載の膜。

16. 蛋白質-含有液(A)が血漿及び血液より成る群から選択されたものであり、そして透析液(B)が蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質としてのヒトの血清アルブミンを含んでいるものである、請求の範囲第9項、第10項又は第11項に記載の方法。

17. 膜が蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質を含んでいる状態で被覆されている、請求の範囲第9項、第10項又は第11項に記載の方法。

18. 膜が蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質としてのヒトの血清アルブミンを含んでいる状態で被覆されている、請求の範囲第17項に記載の方法。

19. 透析液(B)がヒトの血清アルブミンを100ml当たり約1〜約50グラムの濃度で含んでいる、請求の範囲第9項又は第10項に記載の方法。

20. 透析液(B)がヒトの血清アルブミンを100ml当たり約6〜約40グラムの濃度で含んでいる、請求の範囲第9項又は第10項に記載の方法。

21. 透析液(B)がヒトの血清アルブミンを100ml当たり約8〜約30グラムの濃度で含んでいる、請求の範囲第9項又は第10項に記載の方法。

22. 透析液(B)がヒトの血清アルブミンを100ml当たり約8〜約20グラムの濃度で含んでいる、請求の範囲第9項又は第10項に記載の方法。

23. 請求の範囲第1〜8項のいずれか1項に記載の膜を含んで成る透析装置を含んでいる、蛋白質-結合物質を含有する血漿又は血液からこれらの蛋白質-結合物質を分離するための使い捨てセット。

24. 透析装置が透析液(B)の側にヒトの血清アルブミンを含有する液体を含んで、請求の範囲第23項に記載の使い捨てセット。

25. 請求の範囲第1〜8項のいずれか1項に記載の膜を含んで成る透析装置、第二の常用の血液透析用透析装置、並びに、好ましくは、管材料で相互連結された、常用の血液透析用木炭吸着材装置と常用の血液透析用イオン交換樹脂装置、及びヒト血清アルブミン含有透析液(B)の装置を含んでいる、蛋白質-結合物質を含有する血漿又は血液からこれら蛋白質-結合物質を分離するための使い捨てセット。

26. 請求の範囲第1〜8項のいずれか1項に記載の膜を含み、かつ透析液

9. 蛋白質-結合物質を含有する蛋白質-含有液(A)を透析液(B)に対して、該蛋白質-結合物質を透析液(B)側に通過させる膜により、及び該蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する、透析液(B)中に遊離の状態で存在するか、及び/又は該膜の少なくとも1つの面に結合されている蛋白質により透析することから成る、該蛋白質-含有液(A)から蛋白質-結合物質を分離する方法。

10. 蛋白質-結合物質を含有する蛋白質-含有液(A)を、該蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質を含有する透析液(B)に対して、膜の少なくとも2つの部分を含む膜により透析することから成る、該蛋白質-含有液(A)から該蛋白質-結合物質を分離する方法にして、該膜の一方の部分は該蛋白質-結合物質と水溶性物質は通過させるが、蛋白質-含有液(A)中の該蛋白質-結合物質を結合した蛋白質(膜)と透析液(B)中の受容体蛋白質は排除する実効分離機能を有する部分であり、他方の部分は出入-及び吸着-機能を有する部分であり、そして該膜は該蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質で被覆されているものである、前記方法。

11. 蛋白質-含有液(A)の側にトンネル-様構造を持つ、実効分離機能を有する1つの部分と透析液(B)の側に出入-及び吸着-構造を持つ部分を含み、該トンネルは約10 μ m未満の長さ、蛋白質-含有液(A)中の蛋白質と透析液(B)中の受容体蛋白質を排除すべく十分に小さい直径を有するものである、請求の範囲第9項又は第10項に記載の方法。

12. 膜のトンネルの長さが約5 μ m未満である、請求の範囲第11項に記載の方法。

13. 膜のトンネルの長さが約0.1 μ m未満である、請求の範囲第11項に記載の方法。

14. 膜の材料がポリスルホン系、ポリアミド系、ポリカーボネート系、ポリエステル系、アクリロニトリル重合体系、ビニルアルコール重合体系、アクリレート重合体系、メタクリレート重合体系及び酢酸セルロース重合体系より成る群から選択されたものである、請求の範囲第11項に記載の方法。

15. 膜の材料がポリスルホンである、請求の範囲第14項に記載の方法。

(B)の側にヒト血清アルブミン含有液が充填されて成る透析装置。第二の常用の血液透析用透析装置、管材料で相互連結された常用の血液透析用木炭吸着材装置と、好ましくは常用の血液透析用イオン交換樹脂装置、及びヒト血清アルブミン含有透析液の装置を含んでいる、蛋白質-結合物質を含有する血漿又は血液からこれら蛋白質-結合物質を分離するための使い捨てセット。

27. イオンの形で、ナトリウムを約130〜約145ミリモル/1000ml、カルシウムを約1.0〜約2.5ミリモル/1000ml、カリウムを約2.0〜約4.0ミリモル/1000ml、マグネシウムを約0.2〜約0.8ミリモル/1000ml、クロリドを約100〜約110ミリモル/1000ml、アセテートを約2〜約10ミリモル/1000ml及びヒト血清アルブミンを約1〜約50グラム/100ml含んで成る、血液透析を緩衝剤とする透析液(B)。

28. イオンの形で、ナトリウムを約130〜約145ミリモル/1000ml、カルシウムを約1.0〜約2.5ミリモル/1000ml、カリウムを約2.0〜約4.0ミリモル/1000ml、マグネシウムを約0.2〜約0.8ミリモル/1000ml、クロリドを約100〜約110ミリモル/1000ml、バイカーボネートを約30〜約40ミリモル/1000ml、アセテートを約2〜約10ミリモル/1000ml及びヒト血清アルブミンを約6〜約40グラム/100ml含んで成る、血液透析を緩衝剤とする透析液(B)。

29. イオンの形で、ナトリウムを約130〜約145ミリモル/1000ml、カルシウムを約1.0〜約2.5ミリモル/1000ml、カリウムを約2.0〜約4.0ミリモル/1000ml、マグネシウムを約0.2〜約0.8ミリモル/1000ml、クロリドを約100〜約110ミリモル/1000ml、バイカーボネートを約30〜約40ミリモル/1000ml、アセテートを約2〜約10ミリモル/1000ml及びヒト血清アルブミンを約8〜約30グラム/100ml含んで成る、血液透析を緩衝剤とする透析液(B)。

30. イオンの形で、ナトリウムを約130〜約145ミリモル/1000ml、カルシウムを約1.0〜約2.5ミリモル/1000ml、カリウムを約2.0〜約4.0ミリモル/1000ml、マグネシウムを約0.2〜約0.8ミリ

モル/1000ml、クロリドを約100～約110ミリモル/1000ml、
 バイカーボネートを約30～約40ミリモル/1000ml、アセテートを約2
 ～約10ミリモル/1000ml及びヒト血清アルブミンを約8～約20グラム
 /100ml含んで成る、酢酸塩を緩衝剤とする透析液(B)。

31. イオンの形で、ナトリウムを約130～約145ミリモル/1000ml、
 カルシウムを約1.0～約2.5ミリモル/1000ml、カリウムを約2.
 0～約4.0ミリモル/1000ml、マグネシウムを約0.2～約0.8ミリ
 モル/1000ml、クロリドを約100～約110ミリモル/1000ml、
 アセテートを約30～約40ミリモル/1000ml及びヒト血清アルブミンを
 約1～約50グラム/100ml含んで成る、酢酸塩を緩衝剤とする透析液
 (B)。

32. イオンの形で、ナトリウムを約130～約145ミリモル/1000ml、
 カルシウムを約1.0～約2.5ミリモル/1000ml、カリウムを約2.
 0～約4.0ミリモル/1000ml、マグネシウムを約0.2～約0.8ミリ
 モル/1000ml、クロリドを約100～約110ミリモル/1000ml、
 アセテートを約30～約40ミリモル/1000ml及びヒト血清アルブミンを
 約8～約40グラム/100ml含んで成る、酢酸塩を緩衝剤とする透析液
 (B)。

33. イオンの形で、ナトリウムを約130～約145ミリモル/1000ml、
 カルシウムを約1.0～約2.5ミリモル/1000ml、カリウムを約2.
 0～約4.0ミリモル/1000ml、マグネシウムを約0.2～約0.8ミリ
 モル/1000ml、クロリドを約100～約110ミリモル/1000ml、
 アセテートを約30～約40ミリモル/1000ml及びヒト血清アルブミンを
 約8～約30グラム/100ml含んで成る、酢酸塩を緩衝剤とする透析液
 (B)。

34. イオンの形で、ナトリウムを約130～約145ミリモル/1000ml、
 カルシウムを約1.0～約2.5ミリモル/1000ml、カリウムを約2.
 0～約4.0ミリモル/1000ml、マグネシウムを約0.2～約0.8ミリ
 モル/1000ml、クロリドを約100～約110ミリモル/1000ml、

明 細 書

蛋白質含有液から蛋白質-結合物質を透析により分離する膜と方法

発明の説明

1. 技術分野

本発明は膜及び膜輸送法、特に蛋白質-含有液、例えば血漿及び血液から望ま
 しくない又は潜在的に有害な蛋白質-結合物質(PBS)、及びもし存在するな
 らば水溶性物質(低分子重量及び中分子重量の物質)及び/又は脂溶性物質を上記膜
 を使用する透析により分離する効果的な方法に関する。

2. 背景

腎臓のある蛋白質に強く結合した物質のその蛋白質からの、透析による分離は
 不可能であるか、又は少なくとも多数の困難を伴う。これは蛋白質が血液又は血
 漿のような複雑な混合物の中に含まれている場合に特に当てはまる。

例えば末期腎臓病(ESRD、尿毒症)において、高剤分離技術が血液からの
 親水性毒素の分離に広く受け入れられている。今日、腎移植が有効でない場合に、
 血液透析(HD)を続けることがESRD患者に採られる生命維持の長期治療法
 となっている。しかし、蛋白質が結合した毒素又は脂溶性の毒素の除去は医学に
 おいて現在未解決の問題として残っている。患者における種々の外因性及び内因
 性中毒の原因には、特にa1bAV8、37mln-結合毒素(ABT)が関与
 していることが明らかにされている。

しかし、脂肪酸、奇数酸、カブロン酸、カプリル酸、チロキシンとトリプトフ
 ァン、非共役ビリルビン、メルカプタン酸、ジゴキシン様免疫反応性物質、ベン
 ゴアゼピン様物質、芳香族アミノ酸及びフェノール類等のABT類が、肝臓
 不全(FHF)における肝性脳障害及び大脳水腫の発症原因となっていると思わ
 れる。

これらの物質は、少なくとも一師は、FHFに認められる致死性大脳症の原因
 となっていると思われる。更に、FHFには、典型的には、凝血異常、呼吸欠
 陥、低酸素症、肺水腫、電解質平衡異常、酸-塩基障害、腎臓不全、低血圧症、

アセテートを約80～約40ミリモル/1000ml及びヒト血清アルブミンを
 約8～約20グラム/100ml含んで成る、酢酸塩を緩衝剤とする透析液
 (B)。

心臓機能不全、敗血症、多臓器不全及び死に至る出血が伴われる。その死亡率は、
 例えば患者の年齢と入院時における脳障害の程度に依存して、これまでずっと変
 わらず、80～100%の高水準にあった。

慢性肝不全においては、一次毒素は異なるだろう(例えば、エタノール)けれ
 ども、肝臓の代謝が不十分なこと起因して同じABT群が血中及び脳の中に蓄
 積する。従って、FHFに普通認められる脳障害のような症状はこれらの患者に
 も生ずることがあり、しかもFHFの態相に似ている急性の病勢悪化がしばしば
 認められる。

新生児の高ビリルビン血症がもう一つの臨床上の関心のある内因性中毒である。
 この高ビリルビン血症の形には、血液-脳バリアーが未発達である故に、新生児
 の脳に対して損傷性の作用があることが知られている。成人におけるビリルビン
 の毒性作用は検討段階であるが、少なくとも非常に高い濃度においてはその毒性
 作用を明確に証明できると思われる。

更に、例えば8環式抗うつ剤、ジゴキシン、ジギトキシン、テオフィリン又は
 ベンゾジアゼピンによる偶発的過剰投与又は自殺(suicide)中毒の
 場合において高アルブミン-結合速度を有することが知られている非常に多数の
 薬剤が存在する。

上記の場合のABTの重要性は一般に知られていることであるが、患者は規則
 的なHD治療を受けているにもかかわらず、ESRDにおいてアルブミン-結合
 毒素、例えばフランカルボン酸類、インドキシルサルフェート、アルミニウムイ
 オン、フェノール類、その他の有機酸の有害な蓄積もある。一方では“中分子
 量”範囲内の“尿毒症毒素”に対する不満足な研究、また他方では尿毒症の血漿
 がその膜外濾過の速度より大きな毒性作用を示すと言う事実は、“尿毒症毒素”
 のあるものは蛋白質を結合させ得るだろうと言う仮説を導いた。

一方では、1978年と言う早い時期にその起源を持つこの理論は、アメリカ
 ン・ソサィティ・フォー・アーティフィシャル・インターナル・オルガニズ
 (American Society for Artificial Internal Organs) (1993)や、米国、
 欧州及び日本の多くの専門家によって受け入れられた。これは、アルブミン-結
 合物質を非脂溶性レベルに保つために、肝臓だけでなく腎臓も血液からのそれら物

質の分離に因与していることを示している。このことはある種の薬剤と指示薬物質（例えば、フェノールレッド）について既に知られていることであるが、最近になってフラン誘導体についても、そのことが血液透析によっては十分に最後でできない腎臓の特別な排泄機能として明らかにされた。これは患者の透析においてこれら分子の濃度が、病態生理学的に関係があるであろうレベルに達することを説明するものである。このことの重要性を示すものであるが、血液透析を受ける慢性患者に害を及ぼすフランカルボン酸はミトコンドリアの細胞呼吸の強い抑制剤であることが明らかにされた。フラン誘導体は、更に、インビトロで示される通り、DNA合成を妨害することによって細胞増殖の抑制剤として作用する。

ほとんど全ての患者に、高度に特化した、又は増殖性の組織（例えば、造血組織）が不十分であることによって引き起こされる、ESRDにおいてHD治療を続けることのインビボの関係長期合併症（long-term complications）（例えば、透析に関係した貧血、免疫反応の低下、高感染率、脳障害）が認められる。これらのインビトロとインビボの結果における関係を示唆するものであるが、臨床研究は、例えば血液透析を受けている患者の貧血の程度はフランカルボン酸の血漿レベルと強く相関することを見出した。

上記疾病の全ての状態に共通していることは、原因にABT関与しているだけでなく、集中症候と移植、又は補助治療（例えば、エリトロポイエチン）と再度入院を伴う長期治療のいずれかの治療コストが非常に高いことである。ABTが関係する疾患には、一方では患者数が多いことと治療コストが高いことにより経済的にかなりの程があり、また他方では死や治療無効に至らしめる確率的な予後の悪さがある（例えば、全世界で慢性HDを受けている患者数は400,000人であり、年当たりの治療回数はおよそ6千万回である）。

ABTが関係する疾病の治療—技術状態

1. 透析及び限外濾過

ABTは、非透析性のアルブミン分子に対するそれらの親和性の故に、インビトロ及びインビボで透析液に有意の強度には通過して行くことができない。更に、これらABT間の多くは極めて親水性で、水には可溶でない。

普通の血液透析は、血漿から低分子の物質（＜1500ダルトン）は効果的

に分離するが、肝不全の有害な作用の原因であると考えられる蛋白質—結合物質は分離しない。例えば大気孔のポリアクリロニトリル膜を使用する血液透析は、低分子物質に加えて中分子（1500—5000ダルトン）の物質は効果的に分離するが、この場合も真核動物で蛋白質—結合物質は分離しない；デ・グロット、GH（De Groot, GH）、シャーム SW（Schalm SW）、シフト I（Schlicht I）：虚血性の肝壊死を持つビグにおける大気孔血液透析法；ランダム化研究、肝腎臓学、第81巻（1984年）、第254頁；デ・グロット、GH、シャーム SW、シフト I：ビグの急性肝不全における大気孔膜による血液透析とクロス—透析との比較（cross-dialysis）、EUR. J. Clin. Invest.、第13巻（1983年）、第65頁を参照されたい。

従って、透析及び限外濾過はこれら物質の分離には満足な方法ではない。

2. 膜透析

別の治療法として膜透析（PD）を受けている患者は1回のPD期間中に総血漿アルブミンの10%までを失うが、この途中で有毒なアルブミン—結合物質（ABT）も勿論失う。臨床研究では、HD患者の典型的な長期合併症、特に前記の貧血はPD患者には観察することができなかった。しかし、PDによるアルブミン—結合物質のこの向上した除去にはアルブミンの損失が付随する。このアルブミンの損失は死亡率の増加と相関する。更に、PDは腹膜炎を起こす高い危険と関連がある。

3. エリトロポイエチン療法

エリトロポイエチン療法は、部分的には、透析／原動機関連貧血を完全に克服するものであるが、高価である。貧血の理由は内因性エリトロポイエチンの欠乏ではない。動脈性高血圧がこの療法において最もしばしば見られる悪影響の一つである。

4. 腎臓移植

この方法でESRDにおいてABTの除去率が35で、不十分であると言う問題を改善することができる。それにもかかわらず、それには、手術の危険、強い免疫低下、高率の感染の危険を含めて、多数の難しい合併症がある。総寿命の

予期値はHD治療と違わない。

5. 血液濾過／血漿濾過

イオン交換樹脂及び木炭等の異なる又は他の吸着剤上での血液濾過又は血漿濾過も有効であるが、十分に特異性ではない。これらの方法もホルモン（コルチコステロイド類、チロキシン）に似た本質的物質を除去する。これらのホルモンはそれら自身の輸送蛋白質（コルチコステロイド輸送蛋白質又はチロキシン輸送蛋白質）に結合されている。

これに因ってなされた研究の大部分において、血液は木炭又はイオン交換樹脂が入っている吸着剤カラムを通して濾過された。この方法で蛋白質—結合毒素は効果的に除去されたが、これには次の欠点が付随した：

- a) 血液細胞、特に血小板の損失、
- b) 凝固因子の損失、
- c) 血液細胞（血小板、白血球）の活性化、
- d) 補体系の活性化、
- e) 結合の絶対的非特異性モードに起因する必須血漿成分の血液化合物（ホルモン、ビタミン、成長因子）の損失、
- f) 特に木炭吸着剤が用いられたときの微小粒子の放出。

木炭濾過に見られる悪影響を少なくするために、木炭粒子は色々な血液—適合性物質で被覆されるが、これら木炭吸着剤が示す蛋白質—結合物質に対する結合能は、低い。マイクロカプセル化された木炭上での血液濾過は血漿から低分子物質（＜1500ダルトン）を効果的に除去するが、肝不全の有害な作用の原因であると考えられる蛋白質—結合物質は除去しない。

全ての体外透析技術及び吸着技術の内、アルブミン—被覆樹脂（例えば、アンバーライト（Amberlite）XAD-7）又はアルブミンが共有結合されたアガロースビーズ上での血液濾過がビリルビン、その他の有毒な蛋白質—結合有機アニオンを真核動物の血液から効果的に除去することが明らかにされた【ウィルソン RA（Wilson RA）、ウェブスター KH（Webster KH）、ホフマン AF（Hofmann AF）：人工肝臓に向かって：肝不全に関係した非結合及び蛋白質—結合血漿化合物のインビトロでの除去、

Gastroenterol.、第62巻（1972年）、第1191頁；シャーム SW（Scharschmidt BF）、プロッツ PH（Plotz PH）、バーク PD（Berk PD）：アフィニティークロマトグラフィーによる血液からの性質の除去、II. アルブミン—共役アガロースビーズ上での血液濾過による貧血症状を持つラットの血液からのビリルビンの除去、J. Clin. Invest.、第53巻（1974年）、第786頁】。この方法の選択性又は可能性のある悪い作用に関して評価はなされなかった。しかし、これらのアルブミン—被覆吸着剤は低分子及び中分子の物質を除去しなかった【ザキム（Zakim）及びボイヤー（Boyer）（編集）、肝臓学、肝疾患の教科書、W. B. ソーニングス社（W. B. Saunders Company）、1990年、第479—482頁】。

結論として、血液—濾過又は血漿—濾過は非選択的な方法のみである。

6. 血漿交換

この方法では、患者の血漿が血液から濾過又は遠心分離で分離され、アルブミン溶液又は血漿で置換される。この方法は次の欠点を示す：

- a) ほとんどの蛋白質—結合毒素は血漿ばかりでなく、組織にも分布される。血漿交換期間後、毒素の濃縮された血漿への再分布が起こる。これにはこの治療を受けているFHPの患者が昏睡から覚めるが、それは治療期間の間だけで、治療が終わった後はまた深い昏睡に落ち入ると言う臨床上の観察が得られた。かくして、血漿交換はそれを有効なものにするためには頻率に行われなければならないが、これは以下に述べる典型的な免疫反応に導いた。
- b) 頻繁な血漿交換に由来する観察された免疫反応は長い間血漿からアレルギー性反応乃至アナフィラキシー反応として知られていた。特異的発見は“輸血肺症”として記載された。
- c) ウイルス感染の危険が存在する（HIV、肝炎）。
- d) FHPでは、その生体は臓器の再生性を高めるために成長ホルモンの分泌が多くなって大量の脂肪を蓄積させると言う反応を示す。これらの成長ホルモンのレベルは健康なヒトの場合より高く、従ってドナーの血漿には存在しない。
- e) 血漿交換は高価である。

7. 交換輸血

ひどい新生児一高ビリルビン血症では、今日、交換輸血が特に選ばれる治療法である。この療法は回復不能な脳の損傷が予防されるので、患者には有益である。しかし、輸血には上記で血漿交換について述べたのと同等の欠点がある。

8. その他の体外法

特にP H Fの治療分野に関する、及び蛋白質-結合毒素の除去に対する他の色色な方法が過去何年間もなされて来た:

a) 吸着剤柱療法に対する木炭-含炭中空繊維/透析

木炭をセロロースの膜に充填することによって透析の血液適合性と木炭吸着の有効性とを併せ持たせ、或いは“中分子量分子”を除去するために吸着剤膜層(粉末木炭及びイオン交換樹脂)を可逆的に透過させる試みは期待したものに金にならないか、又は期待したものに十分に近付かなかった。特に、A B Tの蛋白質が強く結合した部分(例えば、非共有ビリルビン)の除去は不十分であった。この理由、本発明者の見解では、以下に述べる“トンネル効果”についての性質を欠く膜を使用したことにあった。

b) 脂溶性液体膜

脂溶性の液体を充填して中分子量の脂溶性及びメルカプタン類のような水不溶性の化合物が通過できるようにした親水性のポリマー半透膜を使用することによって、蛋白質-結合毒素を除去する努力が更になされた。アルカリ性透析液(p H 13)の脂溶性がこれら毒素の受容体溶液として提案された。この方法の不利な点は次の通りである:

1. A B T類のあるものはこの液体膜に不溶性であり、従ってそれらは除去プロセスから排除される(非共有ビリルビン)。

2. 脂溶性毒素(例えば、アンモニア)のその液相中の不溶性はそれらの除去も阻み、そして前記中毒のほとんどが脂溶性毒素及び水溶性毒素を含めて複雑な性質のものであるので、更なる透析膜の追加使用を必要とした。追加の透析装置の使用により、体外の血液容量も血液-ポリマーの接触も増加する。最後に述べるが決して軽視すべきでないものはコストであるが、それは非常に高い。

3. アルカリ性の透析液溶液の使用は患者には潜在的に有害なもので、少なく

は自動的に排除される。かくして、移植は手術に適しないそのような患者に対する十分な解毒処置の必要を避けた。手術に適したこのような多数の患者は、昏睡、低血圧、高い出血の危険を伴うP H Fの故に、手術を受けるには悪化する状態にある。これらの患者には、移植の準備のために十分な“肝臓橋接治療(liver bridging treatment)”が必要であり、そして多くの場合、患者が移植後にP H Fに罹ると、その治療が再び必要になる。最後になるが、決して軽視できないことは、移植は手術に由来して、また免疫抑制治療に由来して高コストを引き起こす。

従って、A B T類のような蛋白質-結合物質を蛋白質-含有液、例を挙げると、例えばP H F、慢性肝不全、偶発的又は自発的薬物過剰投与及びE S R Dを罹患した患者の血液又は血漿から分離する、効果的で安全な、しかも経費がより少ない方法を提供することが有用であろう。この方法は、例えば有価成分、例えば蛋白質のその液体からの望ましくない除去、又は潜在的に有害な(有毒な)物質のその液体に対する感度により液体、例えば血液の恒常性を妨害しないならば有利であろう。

しかし、本発明の1つの目的は、蛋白質-結合物質をこれら物質を含有する蛋白質-含有液から透析により分離する方法を提供することである。本発明のもう1つの目的は、上記蛋白質-結合物質をこれら物質を含有する蛋白質-含有液から透析により分離するための膜を提供することである。

更なる目的は次の説明、図面及び請求の範囲から明らかになるであろう。

発明の概要

本発明は、蛋白質-結合物質(P B S)-これには強く結合されたものさえ包含される-は蛋白質-含有液(A)から、半透膜の助けを借りて、かつP B Sに対して受容体機能を有する蛋白質の助けを借りて、透析液(dialysate liquid)(B)に対して透析することによって除去することができると言う予想外の知見に基づく。

本発明の透析液(B)は、蛋白質-含有液(A)から除去されるべき、一般に蛋白質-含有液(A)中のP B S-蛋白質複合体の中に存在する蛋白質のタイプの蛋白質-結合物質(P B S)に対して受容体機能を有する蛋白質を含有している

とも膜が損傷する場合それは内因性のp H値に影響を及ぼす。

9. バイオハイブリッド(b i o h y b r i d)系

これらの系は自然の解毒をもたらす生体成分(例えば、肝臓切片、肝細胞)を含む血液又は血漿の処理用に設計されたバイオリアクターである。肝臓切片は脆性が限られ、しかも寿命が短いために、細胞に基づく系しか許容できない。この方法の不利な点は次の通りである:

a) この処理に必要とされる細胞を十分な量で与える安定かつ安全な供給量がない。

蛋白質-結合毒素の解毒に最も重要な細胞である肝臓の肝細胞は、今日まで遠征的手法によらないインビトロ培養法で産生することはできなかった。この培養法では、続いて細胞の分化が起こり、従ってこの方法は許り切れない更なる危険と結び付いている。インビトロ培養法で産生することができるとされる肝臓細胞の使用は腫瘍を発生させる危険と、更には予見できない細胞の代謝変化に由来する危険と結び付いている。動物細胞の使用は、一方では患者の血液/血漿と、他方では異種間肝細胞との間の免疫反応と結び付いている。

b) 方法の困難性

細胞又は完全なバイオリアクターを凍結保存できる可能性が乏しいために、デバイスの調製は常に使用直前に行わなければならない。このことはこの方法を高度に専門化されたセンターにしか使用できないものにする。

c) 高コスト

この装置の工程は全て高いコストを伴う。

10. 肝臓移植

肝臓移植は、今日、慢性か急性のいずれかの末期肝不全の患者に特に選ばれる方法となっている。それは肝不全について述べられたエール療法(eil therapies)から最高の長期生存率を示すからである。この方法の制限因子は、適当なドナーの器官の入手性が限られていること(長い待機リスト)、手術の危険、一般的な合併症(例えば、高い感染の危険、高い腫瘍の危険、糖尿病の危険)と関連した拒否反応をさせる、生涯にわたる長い免疫抑制治療である。更に、移植の適応症は極めて厳格に定められ、死に至るような病気の非常に多数の患者

のが好ましい。蛋白質-含有液(A)としての血液又は血漿の場合、透析液(B)中の好ましい受容体蛋白質はアルブミン、特にヒトの血漿アルブミン又はヒトの組み換えアルブミンである。

本発明の膜は概念的に異なる2つの部分を含んでいるのが好ましい。一方の部分は、本発明の方法の条件下でP B S、及びもし存在するならば水溶性物質は通過させるが、液(A)中のP B Sを結合した蛋白質(膜)と透析液(B)中の受容体蛋白質は排除する実効分離機能(actual separating membrane function)を有する部分であり、他方の部分は出入(p o r t)-及び吸着-機能を有する部分である。膜はP B Sに対して受容体機能を有する蛋白質で被覆されているのが好ましい。1つの好ましい態様において、本発明の膜は、液(A)の側に面する、足の長さが約10 μ m以下で、かつ直径が液(A)中の蛋白質を排除すべく十分に小さいトンネル-構造と透析液(B)の側に出入-及び吸着-構造を含む。膜は少なくとも1つの面において、好ましくは透析液(B)の側において蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質の薄いフィルムで被覆されているのが好ましい。

本発明の膜は平らなフィルム、肉厚は薄いが直径は大である管又は、好ましくは、中空の細繊維と云った巨視的形態を有するものであることができる。製造技術、中空繊維膜及び透析については、カーク・オスマー(Kirk-Othmer)のエンサイクロペディア・オブ・ケミカル・テクノロジー(Encyclopedia of Chemical Technology)、第3版、第7巻(1979年)、第564-579頁、特に第574-577頁、第12巻(1980年)、第492-517頁及び第15巻(1981年)、第92-131頁に記載がある。更に、膜及び膜分離法はウルマンのエンサイクロペディア・オブ・インダストリアル・ケミストリー(Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry)、第5版、第A16巻(1990年)、第187-263頁に記載されている。

膜のマトリックス材料は、液(A)側及び透析液(B)側で蛋白質に対して親和性を有する限り、セラミック、グラファイト、金属、金属化合物及びポリマーを含めて多数の材料からできていることができる。今日最も広く使用されている方法は、粉末の焼結、フィルムの延伸、フィルムの放射線照射及びエッチング、

並びに圧縮技術である。本発明の膜に対して好ましい材料はポリスルホン系、ポリアミド系、ポリカーボネート系、ポリエステル系、アクリロニトリル重合体、ビニルアルコール重合体、アクリレート重合体、メタクリレート重合体及び酢酸セルロース重合体より成る群から選択される有機ポリマーである。特に好ましいものは、例えばポリビニルピロリドンで親水性が付与されたポリスルホンの膜である。

膜を正確かつ完全に定義するのはかなり困難なことである。ウルマンの上記引用文献、第190-191頁、No. 2、1及び2、2を参照されたい。膜は構造が均質、微孔質又は不均質、対称若しくは非対称であることができる。膜は中性であってもよいし、或いは特定の結合部又は腔体形成能を持つ官能基を有していてもよい。分離プロセスに現在用いられている最も重要な膜は非対称膜である。ウルマンの上記文献、第219頁以下、No. 4、2を参照されたい。公知の非対称膜は、“フィンガー(finger)”タイプの構造、孔寸法の分布が段階的に変化しているスポンジタイプの構造又は孔寸法の分布が均一であるスポンジタイプの構造を持っている。ウルマンの上記文献、第223-224頁を参照されたい。

本発明の最も好ましい膜の構造は下部構造が高度に多孔質である薄い選択性スキン層から構成され、その孔が膜を多少なりとも膜面に、スキン層から下方に延びているフィンガー又はチャンネルの形で貫通している非対称膜である。非常に薄いスキンが実効膜となり、それは孔を含有していることができる。多孔質の下部構造はスキン層の支持体として役立ち、受容体機能を持つ蛋白質がスキンに接近して行き、そしてスキンを液(A)側から透析液(B)側の方へ透過して行く蛋白質-結合物質を受容する。

分離手順に先立って、膜は次のように準備するのが好ましい。即ち、膜を液(A)側から及び/又は液(B)側から、受容体機能を有する蛋白質を含有する液体、好ましくは受容体蛋白質、好ましくはヒトの血清アルブミンを約1-約50g/100mL、更に好ましくは約5-約20g/100mLの濃度で含有する0.9%NaCl溶液で処理する。処理時間は約15-約40分、好ましくは約18-約37分において約1-約30分、好ましくは約10-約20分であ

る。

本発明の、蛋白質-結合物質、そして勿論存在しているかもしれない普通の水溶性物質の、蛋白質-含有液(A)からの分離法はつぎのように実施される：

精製すべき液(A)を、膜を含む透析装置にその膜の液(A)側に沿って液(A)側で膜面積1平方メートル(sq m)当たり約50-約500mL/分、好ましくは約100-約200mL/分の流量で通し、通過させる。透析液(B)を膜の透析液(B)側に沿って膜面積1平方メートル当たり約50-約500mL/分、好ましくは約100-約200mL/分の流量で、そして好ましくは液(A)と同じ流量で通す。

液(A)から得られる、蛋白質-結合物質、そして多量の水溶性物質を含有する透析液(B)を、次に、常用の透析装置に接続された第二の常用の透析装置に通し、通過させる。水性標準透析液に対する透析を行う。この透析によって、水溶性物質は透析液(B)と標準透析液との間で交換される。かくして、尿酸又はクレアチニンのような水溶性の毒物は透析液(B)から分離することができ、また電解質、グルコース及びpHは透析液(B)中で、従ってまた液(A)中でもその平衡を保たせることができる。得られた、水溶性物質を含まない透析液(B)は、これを次いで木炭-吸着材、例えばガムプロ AB社(GAMBO AB)から得られるアドソーバ(Adsorba)300C又はアサヒ社(ASAHI)から得られるN350、及びアニオン交換カラム、例えばアサヒ社から得られるBR350に通し、通過させて透析液(B)中の蛋白質受容体から蛋白質-結合物質を除去するのが好ましい。精製された透析液(B)を次に本発明の膜の透析液(B)側に戻し、再使用する。

他の有利な点及び利益は、当業者には、次に述べられる詳細な説明から明白になるであろう。

図面の説明

図1は本発明の方法に従って、蛋白質-結合物質(非共役ビリルビン、遊離胆酸、フェノール、スルホプロモファレイン)を血液[液(A)]からインビトロ(試験管内)で分離したその結果を示すグラフである。蛋白質-結合物質(PBS)の減少は血液[液(A)]中の初期濃度に対するパーセントで示され

る。

図2は血液[液(A)]中の初期濃度に対するパーセントで示される、透析液[液(B)]：図1に対応するもので、同じ実験により得られる]における蛋白質-結合物質の増加を示すグラフである。

図3は慢性肝不全が急性悪化した29才の患者の4日間のMARS治療とそれに続く2日間の通常のHDF中の血清ビリルビン濃度を示すグラフである。

図4、図5及び図6は本発明による血液透析による血液精製の態様を例証する図である。

- DA ー透析液A(アルブミン被覆膜)
- DB ー透析液B(常用透析装置)
- ADS A ー吸着材A
- ADS B ー吸着材B
- ポンプ1 ー血液用ローラー(roller)ポンプ
- ポンプ2 ー第一アルブミン透析液用ローラーポンプ
- ポンプ3 ー第二アルブミン透析液用ローラーポンプ
- I-V ー安全装置
- I ー血液用ラインの気泡トラップ
- II ーアルブミン透析液用ラインの気泡トラップ
- III ー血液不足デテクタ
- IV ー毒性低下チャンパー
- V ー安全クランプ
- 入/出 ー血液の流入及び流出
- X/Y ーアルブミン透析液用流動コネクタ(DA)
- U/V ー常用の透析液用流動コネクタ(DB)

血液[液(A)]は“入”から流れ、ポンプで気泡トラップを通過して給送されて透析装置(DA)に入り、そして毒性低下チャンパーを通過し、その後安全クランプを通過。安全装置は本発明の一部ではないが、安全に備する法令上使用しなければならない。アルブミン透析液[液(B)]はローラーポンプ2でコネクタXからコネクタYに向かって、又はコネクタYからコネクタXに向かって給送

されるが、初めは血液不足デテクタ(III)を、また気泡トラップ(II)を通過する血液に対して向流で送られるのが好ましい。その後、液(B)は常用の透析装置(DB)及び、所望によっては吸着材カラム(A及びB)を通過する。

その他の可能性は次の通りである：

ー液(B)は吸着材を通過するだけであって、透析装置は通過しない；

ー液(B)は透析装置DBを通過するだけであって、吸着材は通過しない。

常用の透析装置(DB)は、常用の透析装置から来るものであってもよいし、或いは他の濃度装置又はローラーポンプでバッグから給送されてもよい常用の透析装置に接続される。

発明の詳細な説明

A. 蛋白質-含有液から蛋白質-結合物質を分離する方法

本発明は血液及び血液のような蛋白質-含有液から望ましくないか、潜在的に有害な蛋白質-結合物質及び/又は脂溶性物質を除去する実質的かつ効果的な方法を提供するものである。基本的な手順は常用の高フラックス透析法と同様であるが、以下に記載される幾つかの修正が本発明により施されている。

1. 透析液(B)

透析液(B)は液(A)から除去されるべき蛋白質-結合物質(PBS)に対して受容体として役立つ蛋白質を含有している。受容体蛋白質は液(A)中の蛋白質に結合される物質に対して十分な親和性を有しているべきである。好ましい受容体蛋白質はヒトの血清アルブミンである。受容体蛋白質の濃度は約1-約50g/100mL、好ましくは約5-約40g/100mL、更に好ましくは約8-約30g/100mL、最も好ましくは約8-約20g/100mLである。

透析液(B)は更にNaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、乳酸ナトリウム及びグルコース(水和物のような塩を、特定の患者の血液中の電解質組成に依存した量で含有している。例えば、低カリウム血症を患っている患者の透析では、より高濃度のカリウムが必要とされる。

肌炭酸塩を緩衝剤とする透析液(B)中の好ましいイオン濃度は、ナトリウムについて約130-約145ミリモル/1000mL、カルシウムについて約1.0-約2.5ミリモル/1000mL、カリウムについて約2.0-約4.0ミ

リセル/1000ml、マグネシウムについて約0.2〜約0.8ミリセル/1000ml、クロリドについて約100〜約110ミリセル/1000ml、バイカーボネートについて約30〜約40ミリセル/1000ml、アセテートについて約2〜約10ミリセル/1000ml、ヒト血清アルブミンについて約1〜約50g/100ml、好ましくは約6〜約40g/100ml、更に好ましくは約8〜約30g/100ml、最も好ましくは約8〜約20g/100mlである。

塩酸塩を緩衝剤とする透析液(B)中の更に好ましいイオン濃度は、ナトリウムについて約135〜約140ミリセル/1000ml、カルシウムについて約1.5〜約2.0ミリセル/1000ml、カリウムについて約3.0〜約3.5ミリセル/1000ml、マグネシウムについて約0.4〜約0.6ミリセル/1000ml、クロリドについて約104〜約108ミリセル/1000ml、バイカーボネートについて約34〜約38ミリセル/1000ml、アセテートについて約4〜約8ミリセル/1000ml、ヒト血清アルブミンについて約1〜約50g/100ml、好ましくは約6〜約40g/100ml、更に好ましくは約8〜約30g/100ml、最も好ましくは約8〜約20g/100mlである。

酢酸塩を緩衝剤とする透析液(B)中の好ましいイオン濃度は、ナトリウムについて約130〜約145ミリセル/1000ml、カルシウムについて約1.0〜約2.5ミリセル/1000ml、カリウムについて約2.0〜約4.0ミリセル/1000ml、マグネシウムについて約0.2〜約0.8ミリセル/1000ml、クロリドについて約100〜約110ミリセル/1000ml、アセテートについて約30〜約40ミリセル/1000ml、ヒト血清アルブミンについて約1〜約50g/100ml、好ましくは約6〜約40g/100ml、更に好ましくは約8〜約30g/100ml、最も好ましくは約8〜約20g/100mlである。

酢酸塩を緩衝剤とする透析液(B)中の更に好ましいイオン濃度は、ナトリウムについて約135〜約140ミリセル/1000ml、カルシウムについて約1.5〜約2.0ミリセル/1000ml、カリウムについて約3.0〜約3.5

ミリセル/1000ml、マグネシウムについて約0.4〜約0.8ミリセル/1000ml、クロリドについて約104〜約108ミリセル/1000ml、アセテートについて約33〜約38ミリセル/1000ml、ヒト血清アルブミンについて約1〜約50g/100ml、好ましくは約6〜約40g/100ml、更に好ましくは約8〜約30g/100ml、最も好ましくは約8〜約20g/100mlである。

透析液(B)の1例は、透析液(B)のリットル当たりヒト血清アルブミン約10〜約20重量%、NaCl約6.1g、乳酸ナトリウム約4.0g、KCl約0.16g、CaCl₂×H₂O約0.31g、MgCl₂×6H₂O約0.15g及びグルコース1水和物1.65gを含むものである。

2. 膜

本発明の膜は2つの機能的に異なる部分(領域)を含んでいるのが好ましい。一方の部分はPBSと水溶性物質を本発明の方法の条件下で通過させるが、液(A)中のPBSを結合してしまった蛋白質(膜)と液(B)の受容体蛋白質を排除する実効分離機能を有する部分であり、他方の部分は出入ー及び吸着ー機能を有する部分である。膜はPBSに対して受容体機能を有する蛋白質で被覆されているのが好ましい。1つの好ましい態様において、本発明の膜は液(A)の側に面してトンネル構造を持つ層を含んでいる。そのトンネルの長さは約10μm以下、好ましくは約5μm以下、更に好ましくは約0.1μm以下、最も好ましくは約0.01〜約0.1μmである。トンネルは液(A)中の蛋白質を排除し、好ましくは約20,000〜約80,000ダルトン、更に好ましくは約50,000〜約80,000ダルトンの分子量を有する分子をそれらトンネルを通過させるべく十分に小さい直径を有する。液(A)中の蛋白質に対する膜の篩係数(sieve coefficient)は0.1未満、更に好ましくは0.01未満である。更に、膜は透析液(B)側に出入ー及び吸着ー構造を含むのが好ましい。この部分は透析液(B)中の受容体蛋白質を出入ー及び吸着ー層に侵入させて膜の液(A)から来るPBSを受容すべく十分に開口した構造を有せなければならぬ。更に、この部分の内側表面は以下に述べる被覆法又はPBSの結合に適した他の構造によって吸着される受容体蛋白質を媒介にしての

ばならない:

1. トンネルは十分に短くならず、好ましくは約5μm未満、更に好ましくは約1μm未満、最も好ましくは約0.1μm未満でなければならない。
2. トンネルの直径は望ましくない分子は通過させるくらい大きい、液(A)に含まれる所望の分子の液(B)への、及び受容体蛋白質の液(B)から液(A)への通過は阻止すべく十分に小さくなければならない。液(A)としての血液又は血液の場合、その排除限界は約80,000ダルトンであるのが好ましい。液(A)中の蛋白質に対する膜の篩係数は、好ましくは0.1未満、更に好ましくは0.01未満である。

3. 液(A)側に面する実効膜の層又は構造の化学的、物理的等々の構造は所望とされない物質の通過が、例えば疎水性及び親水性のマイクロメインによって可能とされるそのような構造である。

第二部分: 液(B)側に面する膜の層又は構造は、通常はスポンジ様又はフィンガー様の様式でより多く開口した膜構造を有するものでなければならない。この部分は膜のこの部分内に重要な出入ー及び吸着ー機能を有する:

1. 膜のこの部分の空間の広がった構造に起因して、透析液(B)側から来る受容体蛋白質は上記の液(A)側に面する構造の透析液側の口に接近し、液(A)側からトンネル構造を通過して来る、蛋白質-結合物質のような所望とされない物質を受容することができる。

2. この構造中に存在する大きな縫合面縁に起因して、その構造は、この中間膜の吸着において1種のスパーサーとして機能する結合した分子を介して蛋白質-結合物質(PBS)を極めて少量で吸着するか、又は膜がそれ自体の構造に起因してPBSを吸着する能力を有するならば、PBSが直接膜結合される。この吸着は可逆的であってもよいし、或いは不可逆的であってもよいが、可逆的である方が好ましい。

3. 膜の透析液(B)側に向かって開かれた構造に起因して、外側の膜表面に対して垂直に又は平行に、或いはそれらとは異なる方式で指向するかもしれない透析物の運動で、受容体蛋白質の分子の出入層への輸送と出入層を有する輸送の両者が可能となる。外側の膜表面に対して垂直な運動と輸送は、出入層の中に運動

PBSに対する吸着材として作用する。この吸着は時間中ずっと安定であることもできるし、その逆であることもできる。膜は少なくとも一方の側において蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質の層で被覆されているのが好ましい。本発明の膜を含む市販の透析装置は液(B)側に受容体蛋白質の層を含有していることができる。

本発明の膜は平らなフィルム、肉厚は薄いが直径は大である管、又は好ましくは中空繊維地の巨視的形態を有していることができる。

膜のマトリックス材料は、液(A)側及び透析液(B)側において蛋白質に対して親和性を有している限り、セラミック、グラファイト、金属、金属酸化物及びポリマーを含めて、種々の材料からできていることができる。今日最も広く使用されている方法は、粉体の焼結、フィルムの延伸、フィルムの放射線照射とエッチング、及び転写の各方法である。本発明の膜に好ましい材料はポリスルホン、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリエステル、アクリロニトリル重合体、ビニルアルコール重合体、アクリレート重合体、メタクリレート重合体及び酢酸セルロース重合体より成る群から選択される有機ポリマーである。

本発明において使用される好ましいポリマー類は、例えばポリビニルピロリドンにより親水性が与えられた、高度に透過性の非対称ポリスルホン膜、例えばフレセニウスAG社(Presenius AG)のHP80である。

このような膜と膜のモジュール、透析カートリッジ、人工腎臓等は、例えばフレセニウスAG社から、またガンプロAB社からポリフラックス(Polyflux)として、バクスター社(Baxter Inc.)からCT180Gとして市販されている。

第一部分: 液(A)側に面する膜の層又は構造は蛋白質-結合物質及び水溶性物質、即ち低分子物質及び“中分子物質”の、液(A)側から透析液(液(B)側)への選択的移動を可能にする実効膜となるものでなければならない。しかし、望ましくない物質の正味の有効輸送は、液(A)側から透析液(B)側に向かって減少している、望ましくない物質についての濃度勾配に従って液(A)側から透析液(B)側へと起こる。実効膜には3つの条件が満足されね

して行き、そして液(B)の流れに戻る液(B)の交互に行われるインフラックス(influx)運動とアウトフラックス(outflux)運動で与えられるのが好ましい。このインフラックスとアウトフラックスはローラーポンプを使用することによって得られるパルス様の圧力分布により、又は初めは液(B)に向かって指向され、最後は液(A)に向かって指向されることから生ずる、膜に沿って変化する膜断圧力(transmembrane pressure)の変化(初めのTMPは正、最後のTMPは負)により与えることができる。TMP: 膜断圧力。

しかし、本発明の透析膜は、膜断圧力には、トンネル部分とフィンガー部分又はスポンジ状部分に分けられているのが好ましい。それらは、両方共、本発明の方法を可能にするある種の膜条件を満足しなければならない。理想的なトンネル部分には近い長さ(0.01~0.1μm)、閉鎖され、保持液(retentate)中に保持されるべき所望蛋白質の大きさに近い直径、例えばアルブミンの直径を有するものであろう。言い換えると、トンネル部分には保持液中の、液(A)の通過のある、所望とされる物質を保持し、液(A)中に含まれる蛋白質-結合物質、その他の所望とされない物質が透析液(B)の側に進むのを可能にするべく十分に小さい直径を有すべきである。

本発明の透析膜の理想的な出入/吸着部分は、受容体蛋白質をしてトンネルの透析液側に近い領域に接近せしめ、遠ざかるのを可能にするべく開かれた構造を有する。この部分はPBSを産生、又は結合した受容体蛋白質を媒介にして吸着する大きな内側表面を有する。この部分の構造は、この場合も透析液の流れの交換を更に効果的にするのを可能にするほど小さい直径であるべきである。後者の2点はそれらをそれらの制限でもたらすことができ、それによって他方のものは、吸着が更に望まれるか、又は膜の出入/吸着部分を通る通過が更に望まれるかによるが、ほとんど排除される。

例えば血液又は血液を精製する常用の透析膜は膜又は構造を基準にして分類することができる。膜上の基準は高フラックスであるか、低フラックスであるか、又は高透過性であるかであり、これに対して構造上の基準は、例えば平らであるか、中空繊維であるか、対称であるか、又は非対称であるかである。本発明に有用なトンネル膜(TM)の際には次の理由からこれらの用語では十分に記述

されない:

- a) TMは高フラックス、高透過性の膜であるが、「高透過性」と称されるあらゆる高フラックス膜が全てTMである訳ではない(例えば、ホスバル社(HOSPAL)から入手できるAN89);
- b) TMは非対称であることができるが、あらゆる非対称膜が全てTMである訳ではない(例えば、フレセニアスAG社から入手できるP8);
- c) TMは非対称かつ高透過性であることができるが、あらゆる非対称かつ高透過性膜が全てTMである訳ではない(例えば、トーレイ社(Toray)から入手できるPMMA);
- d) TMは対称であることができるが、あらゆる対称膜が全てTMである訳ではない(例えば、アクソ社(AKZO)から入手できる Cuprophane)。

従って、トンネル膜なる用語は本発明に有用な透析膜の構造上及び機能上の特徴の新しい質を表すものである。

4. 膜の予備処理と条件

本発明の膜には次のようにして予備処理を施すのが好ましい。膜を少なくとも1つの側で、好ましくは液(A)側と液(B)側の両側から受容体蛋白質の溶液により含浸する。含浸工用の好ましい溶液は受容体蛋白質、好ましくはヒトの血清アルブミンを約1~約50g/100mL、好ましくは約6~約40g/100mL、更に好ましくは約8~約30g/100mL、最も好ましくは約8~約20g/100mLの濃度で含有する0.9%NaCl溶液である。含浸用溶液を膜の液(A)側と液(B)側に沿って、受容体蛋白質を膜の両側2つの部分に侵入させ、それら部分に吸着させるのに十分な時間、一般に、約15~約40℃、好ましくは約18~約37℃において約1~約120分間、好ましくは約10~約80分間とし、この場合pH値は約5~約9、好ましくは約7である。この予備処理は膜の使用直前に行うことができるが、予備処理された膜は、受容体蛋白質がヒトの血清アルブミンである場合は、滅菌条件下において最高24℃までの温度で最長2年間貯蔵して置くこともできる。

含浸用溶液は膜操作中に「パルス様の圧力分布」を示すローラーポンプで、

例えば1つは透析液側の隔壁側に、1つは透析液側の血液の隔壁側にある2つのローラーポンプで給送するのが好ましい。両ポンプの圧力分布間に相の遅れが存在し、かくして膜の両側での溶液の効果的な流入、流出が確実に行われるようにするのが好ましい。

5. PBSの蛋白質含有液(A)からの分離法

蛋白質-結合物質(PBS)を蛋白質含有液(A)から分離する方法は次のようにして実施するのが好ましい:

精製すべき液(A)を本発明の透析膜の液(A)側に沿って、透析膜の平方メートル当たり約50~約300mL/分、好ましくは約100~約200mL/分の流量で送す。透析液(B)を膜の透析液(B)側に沿って透析膜の平方メートル当たり約50~約1000mL/分、好ましくは約100~約500mL/分の流量で送す。液(A)、従って液(B)の流量は同じ大きさのオーダーであるのが好ましい。液(A)対液(B)の流量比は約1:0.1~約1:10、好ましくは約1:1~約1:5である。保持液は精製された蛋白質含有液(A)であり、それより蛋白質-結合物質、その他の所望とされない物質が除去される。

本発明の方法の1つの好ましい態様においては、液(A)の第一透析工程は得られた透析液(B)の2つの後処理工程と結合される。

まず、得られた透析液(B)を常用の透析装置に接続されている第二の常用透析装置を通過させる。透析は水性の標準透析液に対して行う。この透析によって、水性物質は透析液(B)と標準透析液との間で交換させることができる。水性物質、尿素、尿酸及び/又はクレアチニンは透析液(B)から除くことができ、また電解質、グルコース及びpH値は保持液である透析液(B)中でその平衡を保たせることができる。その後、透析液(B)を木炭-吸着材、例えばガンプロAB社からのアドソーバ300C又はアサヒ社からのN350に、次いでアニオン交換カラム、例えばアサヒ社からのBR350に送り、通過させて透析液(B)中の受容体蛋白質から蛋白質-結合物質を除去する。精製された受容体蛋白質-含有透析液(B)を次に本発明の膜の液(B)側に戻す。

この方法を蛋白質-含有液(A)中のアルブミン-結合毒素の分離について実験し、試験すると、液中のこれら化合物に著しい低下がもたらされた。

本発明の方法の膜の可能な単純化された態様は次の修正を含むものである。透析液側から来る透析液(B)をもう1つの透析液側に送り、通過させるが、いかなる吸着材にも通さない。透析液側から来る透析液(B)を1つ又は2つの吸着材に送り、通過させるが、他の透析液側には通さない。透析液側から来る透析液(B)をその透析液側の透析液用隔壁の入口に(例えば、ローラーポンプで)直接給送して戻し、かくして透析液(B)の十分な運動とABTの十分な除去を実現する。更にもう1つの単純な修正態様は、ヒトの血清アルブミンを約1~約50g/dl、好ましくは約8~約40g/dl、更に好ましくは8~30g/dl、最も好ましくは約8~約20g/dlの濃度で含む透析液(B)が充満された、透析液用の入口と出口が閉鎖されている透析液用隔壁を備えた透析装置であらう。透析装置は、例えば浸透又は浸透させることによってその全体を運動させることもできる。

本発明の方法の利点は、潜在的に有害な、又は望ましくない蛋白質-結合物質、及び恐らくは望ましくない水溶性物質で汚染された血液又は血清のような生物蛋白質含有液を、その液が蛋白質-結合物質、その他の望ましくない物質をより低い濃度で含有し、その液が透析処理前に持っていた潜在的に有害な、又は所望とされない作用を示さなくなるように、本発明の方法により選択的に精製することができることである。

本発明の方法のもう1つの利点は、生物学的液体の化学的、物理的恒常性がほとんど変化しないこと、即ちそのために使用される方法と透析膜は良好な生物学的適合性を発揮することである。

本発明の方法は、更に、単純、実用的であり、しかも市販の透析装置により大量の生物学的液体、例えば外部回路中の血液を繰り返し何時間も、色々な条件に対して処理するのに適していると言う利点を有する。

蛋白質-結合物質及び水溶性物質を含有する血液又は血清からそれら物質を分離する使い捨てセットは、前記の膜、血液透析用の第二の常用透析装置、血液/液の常用木炭吸着材装置とこの吸着材装置に管材料で接続された血液/液用の常用イオン交換樹脂装置、及びヒトの血清アルブミンを含有する透析液の流量を含んで成ることができる。

特表平7-506765 (9)

蛋白質・結合物質及び水溶性物質を含有する血漿又は血液からそれら物質を分離する使い捨てセットは、また腎臓の膜を有し、透析液(B)側にヒト血清アルブミン含有液が充填されている透析装置、血液透析用の第二の常用透析装置、血液透析用の常用木炭吸着材装置とこの吸着材装置に管材料で接続された血液透析用の常用イオン交換樹脂装置、及びヒトの血清アルブミンを含有する透析液の装置を含んで成ることもできる。

B. PBS及び水溶性物質の除去の評価

特に、光に対して不安定なビリルビンの分解を避けるために金化合物を光照射の直後に測定した。

—プロモスルホフタレイン: ベッチ(BECH)の方法により分光光度法で測定。

—ビリルビン: a) ジェンドラシク(JENDRASSIK)の方法により分光光度法で測定; b) コダック・エタケム(KODAK EKTACHEM)の乾式の化学的方法。これら両方法は使用濃度範囲で良好な相関性を示した。

—フェノール: a) ベッチャー(BECHER)の方法により分光光度法で測定; b) HPLC。この場合もこれら両方法は使用濃度範囲で良好な相関性を示した。

—遊離脂肪酸: ローレル(LAUREL)とチブリング(TIBLING)の方法による(即ち、脂肪酸はエステルを生成させなかった)。

—ジゴキシン: アボット(ABBOTT)の分析装置/乾式の化学的方法。

—ジギトキシン: アボットの分析装置/乾式の化学的方法。

—クレアチニン、尿素、尿酸、トランスアミナーゼ、血糖値: コダック・エタケムの乾式の化学的方法。

C. インビトロモデル

生物学的液体中の減少して行く濃度のみならず、膜輸送プロセスを膜に対する吸着と区別する本質的な基準である透析液中の増加して行く濃度も測定可能にするために、2つの閉鎖ループ式隔室(血液用隔室と透析液用隔室)を備えた常用の透析装置を用いる。高さが約2.5 cmと約1.0 cmで、容量が各々500 mlである、一方は血漿を含有する生物学的液体用の容器としての、他方は透析

液用装置の容器としての2本のガラス瓶を用いる。これら瓶は共に、1本は血液又は透析液の流入用のものであり、もう1本は血液又は透析液の流出用のものである2本の管のためのコネクタをそれぞれ備えている。“分岐原理”を避けるためには、流入と流出との間の距離は10 cmより短くすべきではない。各瓶の2つのコネクタを、透析用の常用ローラーポンプを使用できるようにするシリコーンセグメントを各々備えている2本の可塑性プラスチック管(約100 cm、直径約8 mm)と接続する。これら2本の管の血漿が入っている瓶から離れた方の他端を透析装置の血液側のコネクタと次のようにに接続する: 瓶の流出側を透析装置の透析液流入側と接続し、透析装置の透析液流出側を瓶の流入側と接続する。それら2本の管の透析液が入っている瓶から離れた方の他端を透析装置の透析液側のコネクタと次のようにに接続する: 瓶の流出側を透析装置の透析液流入側と接続し、透析装置の透析液流出側を瓶の流入側と接続する。臨床血液透析から知られている通り、透析液の流れが透析装置を通過して血漿の流れに対して向流で流れるように設計するために、透析装置の血液流入側を透析液の流出側に配置する。血液用瓶の流入/流出管のシリコーンセグメントは血漿をシマルタン(simultaneous)式ローラーポンプで輸送するために用いられる。また、透析液用瓶の流入/流出管のシリコーンセグメントは、透析液をシマルタン式ローラーポンプで輸送するために用いられる。こうして両隔室の流入/流出容量間に平衡が保たれ、結果に影響を及ぼすことがあり得る膜横断水の損失が回避される。

インビトロの実験に用いられる血漿の調製

a) ポリスルホン透析膜を使用しての本発明の方法の評価用

ヒトのヘパリン化された血漿を若い男性ドナーから採取し、蛋白質の結合率が高いモデル物質で富化した:

—カプリル酸(750 mg/1000 ml)

—フェノール(530 mg/1000 ml)

—非共役ビリルビン(11 mg/1000 ml)

—スルホプロモフタレイン(230 mg/1000 ml)

非共役ビリルビン110 mg、スルホプロモフタレイン230 mg、カプリル酸750 mg及びフェノール530 mgを0.1 M・NaOH溶液50 mlに溶

HF80: フレセニウスAG社、ドイツ

b) 他透析膜の評価用

ダイアフィルター(Diafilter) 30:

アミコン社(AMICON)、U. S. A.

HF88: ガンプロAB社、スウェーデン

ランディア・プロ(LUNDIA PRO) 5:

ガンプロAB社、スウェーデン

CT110G: バクスター(BAXTER)、U. S. A.

スパン(SPAN): オルガノン・テクニカ(ORGANON TECHNICA)、オランダ

KF201・エバル(EVAL) N13: カワズミ(KAWASUMI)、日本

B1-2, 1U: トーレイ・メディカル社(TORAY Medical Co.), 日本

フィルトラ(FILTRAL) 16: ホスバル社(HOSPAL)、フランス

透析膜、各会社から得られた技術情報:

*フレセニウスAG社の高透過性ポリスルホン膜はカットオフ(cut off)(約40,000ダルトン)を決める0.5~1 µmのスキン層を持つ非対称膜である。スキン層は高フラックス透析膜用の厚さ約40 µmの、及び血液透過(hemofiltration)膜用の厚さ約35 µmの多孔質の支持層で支持されている。このポリスルホン膜の疎水性の表面構造はポリビニルピロリドンで親水性化されている。

フレセニウスAG社の低透過性ポリスルホン中空糸膜はカットオフ(約5000ダルトン)を決める、厚さ約40 µmの多孔質の支持層で支持されている0.5~1 µmのスキン層を持つ非対称膜である。このポリスルホン膜の疎水性表面構造はポリビニルピロリドンで親水性化されている。これらの組織は次のフレセニウス透析装置に存在する: F3, F4, F5, F6, F7, F8。

*ホスバル・パン膜(AN88)はポリアクリロニトリルに基づく、高透過度

解させた。その後、この溶液にヒトのアルブミン[脂肪酸を含まない、シグマ社(SIGMA)] 2.5 gを溶解した。その後、30%酢酸溶液の添加によりそのpH値を7.4に調整した。その後、この毒素混合液をヘパリン化血漿950 mlと混合した。この血漿溶液500 mlを血漿用瓶に満たした。

透析液の組成: 20% (20 g/100 ml) ヒトアルブミン溶液100 mlを市販のCVVH透析液400 mlと混合した。このアルブミン含有溶液500 mlを透析液用瓶に満たした。

b) 他透析膜/血液フィルターの評価用

ヒトのヘパリン化血漿を若い男性ドナーから採取し、蛋白質の結合率が高いモデル物質で富化した:

—非共役ビリルビン(11 mg/1000 ml)

—スルホプロモフタレイン(230 mg/1000 ml)

同様に、尿毒症と透析の実効性のマーカーとして知られるモデル物質で富化した:

—クレアチニン(6 mg/100 ml)

—尿素(100 mg/100 ml)

—尿酸(17 mg/100 ml)

非共役ビリルビン110 mg、スルホプロモフタレイン230 mg、クレアチニン60 mg、尿素1000 mg及び尿酸170 mgを0.1 M・NaOH溶液50 mlに溶解した。その後、この溶液にヒトのアルブミン(脂肪酸を含まない、シグマ社) 2.5 gを溶解した。その後、室温での30%酢酸溶液の添加により、そのpH値を7.4に調整した。その後、この毒素混合液をヘパリン化ヒト血漿950 mlと混合した。この血漿溶液500 mlを血漿用瓶に満たした。

瓶を満たした後、それら瓶を閉じて気密にし、そしてポンプセグメント(流入及び流出)をシマルタン式ローラーポンプに、各(血漿と透析液)サークルを向流式に再循環させるように設置した。流量は100 ml/分に調整した。温度は37℃に調整した。

次の透析膜/血液フィルターを使用した:

a) 本発明の方法の、原理の評価用

を持つ膜厚50 μ mの対称膜である。この膜はフィルトラル8-20に中空繊維として、またバイオスバル(Biospal)に存在する。

*オルガノン・テクニカ社のスパン膜はポリアクリロニトリルに基づく非対称膜である。

*ダイアフィルターは多孔質の支持層で支持されている、カットオフを決めるスキン層を有する非対称の、中空繊維より成る血液フィルター膜である。この血液濾過膜は次のアミコン社のフィルターに存在する: ミニフィルター(Mini filter)、ミニフィルタープラス、ダイアフィルター10、20、30及び50。

*ランディア・プロ5膜は平らなポリカーボネート製透析膜である。

*ガンプロAB社のポリアミド中空繊維膜は3種の改良型で市販される対称膜である:

-高フラックス透析及び血液ダイアフィルトレーション(hemodiafiltration)用の、3層、高親水性度のもので設計された、肉厚50 μ mのポリアミド。中空繊維の内径は220 μ mである。これらの中空繊維はポリフラックス(Polyflux)130及びポリフラックス150(商標名)に存在する。

-血液濾過用の、3層、高親水性度のもので設計された、肉厚60 μ mのポリアミド。中空繊維の内径は215 μ mである。これらの中空繊維はFH22、FH77、FH88に存在し、FH66(商標名)の場合肉厚は50 μ mである。

-水の膜外濾過用(免疫物質の分離用)の、親水性度がより低い“フィンガー構造”のもので設計された肉厚80 μ mのポリアミド。中空繊維の内径は215 μ mである。これらの中空繊維はU2000及びU7000(商標名)に存在する。

*KF201・エバルN13は肉厚32 μ mのエチレン-ビニルアルコール共重合体中空繊維膜である。この膜もKF101・エバルN16に存在する。

*トーレ・メディカル社のPMMA中空繊維膜はポリメチルメタクリレートに基づく、肉厚30 μ mの、B1-1、8U及びB1-2、1Uに存在するか、又は肉厚20 μ mの、B2-0、5乃至B2-2、0及びB1-0、6H乃至B1-1、6Hに存在する非対称膜である。

*バクスターCT100Gは三酢酸セルロースの中空繊維膜である。それは非対称分布の孔径法を有し、肉厚が15 μ mである高度(hybrid)セルロース材料であると記述されている。このタイプの中空繊維もバクスターCT100Gに存在する。

各透析装置を予備濾過でのその使用前に透析液側のみならず血液側でもヒトの血清アルブミン溶液(5g/100mL)により流量50mL/分で20分間を渡した。

表中の略号:

Alb. - アルブミン

Un. Bil. - 非共役ビリルビン

c. Bil. - 共役ビリルビン

SBP - スルホプロモフタレイン

Ph - フェノール

PFA - 遊離酸、この場合カプリル酸

DIG - ジギトキシン

Crea - クレアチニン

Ur. - 酸-尿酸

D. インビトロの試験

a) 原薬の評価

表1: インビトロでの血清(液A)からのPBSの除去(HF80、フレセニアスAG社)、血清濃度(液A中)

時間 (分)	Alb. (g/dl)	Un. Bil. (mg/dl)	SBP (mg/l)	Ph (mg/l)	PFA (mg/l)
0	3.5	11.70	230	528	749
5	3.4	9.38	180	370	502
10	3.4	8.42	151	291	502
30	3.4	7.72	133	190	434
60	3.4	7.02	124	137	419
90	3.3	5.85	117	127	412

透析液(B)中のアルブミンの重要性を証明するために、表1におけると同じ条件下で比較試験を行ったが、ただし透析液(B)中のアルブミンは省いた。結果を比較用表1に示す。

比較用表1: インビトロでの血清(液A)からのPBSの除去(HF80、フレセニアスAG社)、血清濃度(液A中)、アルブミンなしの常用透析液を使用

時間 (分)	Alb. (g/dl)	Un. Bil. (mg/dl)	SBP (mg/l)	Ph (mg/l)	PFA (mg/l)
0	3.5	11.70	230	528	749
5	3.4	11.5	227	420	730
10	3.4	11.42	221	371	723
30	3.4	11.44	218	290	719
60	3.4	11.39	211	270	718
90	3.3	11.40	215	288	724

表2: 血清(液A)からのPBSの除去(HF80、フレセニアスAG社)、透析液濃度(液B中)

時間 (分)	Alb. (g/dl)	Un. Bil. (mg/dl)	SBP (mg/l)	Ph (mg/l)	PFA (mg/l)
0	4.0	0.00	0	0	0
5	3.0	0.9	21	52	149
10	3.1	1.5	48	79	187
30	2.9	1.7	67	100	202
60	2.9	2.1	103	111	217
90	2.8	2.3	119	116	224

比較試験を表2におけると同じ条件下で行ったが、ただし透析液(B)中のアルブミンは省いた。結果を比較用表2に示す。

比較用表2: 血清(液A)からのPBSの除去(HF80、フレセニアスAG社)、透析液濃度(液B中)、アルブミンなしの常用透析液を使用

時間 (分)	Alb. (g/dl)	Un. Bil. (mg/dl)	SBP (mg/l)	Ph (mg/l)	PFA (mg/l)
0	0.0	0.00	0	0	0
5	<0.2	0.0	0	28	0
10	<0.2	0.0	0	79	0
30	<0.2	0.0	0	121	0
60	<0.2	0.0	0	173	0
90	<0.2	0.0	0	181	0

b) 異なるタイプの透析膜/膜からの結果

表3: 血漿(液A)からのPBS及び親水性

毒素のインビトロ除去(アミコン社製

ダイアフィルター)、血漿濃度(液A)

時間 (分)	Alb. (g/dl)	SBP (mg/l)	Un. Bil. (mg/dl)	c. Bil. (mg/dl)	Crea (mg/dl)	尿素 (mg/dl)	Ur. 酸 (mg/dl)
0	3.5	230	11.7	0.6	6.8	120	16.8
30	3.4	86	4.5	0.47	3.2	37	8.8
60	3.3	56	3.9	0.40	2.9	37	8.1

表4: 血漿(液A)からのPBS及び親水性

毒素のインビトロ除去(アミコン社製

ダイアフィルター)、透析物濃度(液A)

時間 (分)	Alb. (g/dl)	SBP (mg/l)	Un. Bil. (mg/dl)	c. Bil. (mg/dl)	Crea (mg/dl)	尿素 (mg/dl)	Ur. 酸 (mg/dl)
0	4.0	0	0.00	0.00	0.0	0	0.0
30	3.3	9	0.46	0.14	3.6	47	10.3
60	3.3	44	0.91	0.36	3.5	47	10.3

表5: 血漿(液A)からのPBS及び親水性

毒素のインビトロ除去(ガンプロ社

からのPHB8)、血漿濃度(液A)

時間 (分)	Alb. (g/dl)	SBP (mg/l)	Un. Bil. (mg/dl)	c. Bil. (mg/dl)	Crea (mg/dl)	尿素 (mg/dl)	Ur. 酸 (mg/dl)
0	3.5	230	11.7	0.6	6.8	120	16.8
30	3.2	47	7.3	0.13	2.8	19	8.0
60	3.1	32	6.3	0.13	2.7	12	3.0

表9: 血漿(液A)からのPBS及び

親水性毒素のインビトロ除去

(オルガノン・テクニカ社からの

スパン)、血漿濃度(液A)

時間 (分)	Alb. (g/dl)	SBP (mg/l)	Un. Bil. (mg/dl)	c. Bil. (mg/dl)	Crea (mg/dl)	尿素 (mg/dl)	Ur. 酸 (mg/dl)
0	3.5	240	11.7	0.6	6.8	120	16.8
30	3.2	187	8.2	0.58	2.7	38	6
60	3.2	148	8.6	0.58	2.5	38	6

表10: 血漿(液A)からのPBS及び

親水性毒素のインビトロ除去

(オルガノン・テクニカ社からの

スパン)、透析物濃度(液B)

時間 (分)	Alb. (g/dl)	SBP (mg/l)	Un. Bil. (mg/dl)	c. Bil. (mg/dl)	Crea (mg/dl)	尿素 (mg/dl)	Ur. 酸 (mg/dl)
0	4.0	0	0.00	0.00	0.0	0	0.0
30	3.6	6	0.19	0.17	2.6	38	7.0
60	3.6	18	0.19	0.18	2.6	38	7.0

c) 透析液(B)中の色々なアルブミン濃度の影響

フェノール富化血漿: ヒトのヘパリン化血漿を若い男性ドナーから採取し、フェノールで富化した。これはフェノール530mgを0.1M・NaOH溶液50mlに溶解することによって行った。その後、ヒトの血漿(脂防酸を含まず、シグマ社)2.5gを加えた。次いで、そのpH値を30%酢酸緩衝液で7.4に調整した。最後に、この毒素混合液を健康な若い男性ドナーから採取し、プールして置いた血漿950mlと混合した。この血漿溶液500mlを透析液Bの血漿側にある血漿用の膜に滴した。

透析液(B): 20%(20g/100ml)ヒトアルブミン溶液200mlを市販のCVVH透析液300mlと混合した。この溶液(即ち、80g/lアルブミン)500mlを透析装置の透析液側にある透析物用膜に滴した。

表6: 血漿(液A)からのPBS及び親水性

毒素のインビトロ除去(ガンプロ社

からのPHB8)、透析物濃度(液B)

時間 (分)	Alb. (g/dl)	SBP (mg/l)	Un. Bil. (mg/dl)	c. Bil. (mg/dl)	Crea (mg/dl)	尿素 (mg/dl)	Ur. 酸 (mg/dl)
0	4.0	0	0.00	0.00	0.0	0	0.0
30	3.5	33	1.08	0.07	3.5	30	6.9
60	3.3	49	1.68	0.12	3.4	28	6.9

表7: 血漿(液A)からのPBS及び親水性

毒素のインビトロ除去(バクスター社

からのCT110G)、血漿濃度(液A)

時間 (分)	Alb. (g/dl)	SBP (mg/l)	Un. Bil. (mg/dl)	c. Bil. (mg/dl)	Crea (mg/dl)	尿素 (mg/dl)	Ur. 酸 (mg/dl)
0	3.4	232	11.7	0.6	6.8	120	16.8
30	3.3	114	8.8	0.5	3.0	29	8.2
60	3.2	84	7.6	0.45	3.0	38	8.3

表8: 血漿(液A)からのPBS及び親水性

毒素のインビトロ除去(バクスター社か

らのCT110G)、透析物濃度(液B)

時間 (分)	Alb. (g/dl)	SBP (mg/l)	Un. Bil. (mg/dl)	c. Bil. (mg/dl)	Crea (mg/dl)	尿素 (mg/dl)	Ur. 酸 (mg/dl)
0	4.0	0	0.00	0.00	0.0	0	0.0
30	3.5	59	0.8	0.02	3.0	38	8.1
60	3.3	84	1.1	0.02	3.0	38	8.1

それらの膜を溶かした後、それらを閉じて気密にし、そしてポンプセグメント(流入及び流出)を、各(血漿及び透析物)サークルの再循環を向流で可能にするようにシマルタン式ローラーポンプに設置した。流量は100ml/分に調整した。温度は37℃に調整した。

表11: 透析液(8g/dl)中のアルブ

ミン濃度が高くなったインビトロ

の血漿(液A)からのフェノール

の除去(HF80、フレセニウス

AG社)、血漿と透析物の濃度

時間 フェノールの濃度(mg/l)

(分)	液A(血漿)	液B(透析物)
0	529	0
2.5	158	148
5.0	132	151
10.0	118	148
20.0	105	147

E. インビボ(生体内)系

市販の透析機器(A2008、フレセニウス社)をインビボ系のハードウェア装置として選択した。本品はいずれも市販のもので、体外治療の血液処理での使用法にはジャーマン・フェデラル・ヘルス・オーソリティー(German Federal Health Authority)【ベルリン(Berlin)】からの安全承認付きであった。

A2008透析機器の血液ポンプを、両側で倒記のようにアルブミン含有液Aと非対称のポリスルホン中空纖維透析膜(1.8平方メートル、HF80、フレセニウス社)を通して160ml/分の連続血液流を供給するために使用した。液(B)の透析物用隔室はアルブミンを5g/100mlの濃度(即ち、静脈内注入又は血漿交換での液体置換に用いられる濃度)で有するリンゲルラクテート溶液1000mlを含有する閉鎖ループ系であった。このアルブミン含有液(B)透析液の120ml/分と言う流量はその機器の第二ポンプ(通常、液体の置換に用いられる)で実現された。更に、アルブミン含有液(B)透析物の8

工程再生法を導入し、従ってPBS一分離槽を高め、そして効果的な血液濾過と水溶性毒素分離の可塑性を付け加えることによってそのインビタ系を改良した。

この順序で含有させた炭(B)透析物のループ

1. A2008の通常の透析物用隔室に接続された追加の、常用の大気孔透析装置(1.3平方メートルのポリスルホン中空繊維透析装置、HP80、フレセニアスAG社)。アルブミン含有閉鎖ループの炭(B)透析物を上記透析装置の血液隔室に通し、通過させたが、他の側では標準炭膜透析物(カリウムイオンイミモル/リットル)を用いた。この第一工程の目的は肝性昏迷の水溶性毒素物質(アンモニア、バランスの崩れたアミノ酸、共役ビリルビン等)を除去して電解質、グルコース及びpH-調節を支え、かつ腎性症候群又は他のタイプの腎不全における腎臓を支え又は代替することであった。

2. 活性化された木炭の市販カラム(アドソーバ300C、ガンプロAB社)。この第二工程の目的は閉鎖ループ系でのアルブミン溶液の再使用を助長するために第一群のPBS(例えば、芳香族化合物、脂肪酸)をそのアルブミンから除去することであった。

3. 市販のアニオン交換樹脂[プラスーバ(Plasorba)BR-850、アサヒ・メディカル社]。この第三工程の目的は非共役ビリルビン及び害触した胆汁酸のアルブミン溶液からの分離であった。

この再生後、アルブミン溶液は血液を更に循環するためにHP80透析装置の炭(B)透析物用隔室に再循環させた。

F. インビタの結果

*患者1

患者は6年のアルコール中毒の病歴後に慢性肝不全の急性代償障害を持つに至った30才の白人女性であった。この患者を保存的(conservatively)に10日間治療したが、成功しなかった。この治療に入るときでは、患者は段階IVの肝性脳障害(深い昏睡、筋の刺激に反応しない患者)の状態にあった。低血圧症、低血糖症及びアルカロシス(alkalosis)が認められた。

生化学: トロンボプラスチン時間(クイック(Quick))18%; 活性化凝固時間は200秒より長かった; 汎トロンビンIIIは1.8%であった; 血小板

数は 73×10^3 /リットル(減少傾向あり)であった。総ビリルビンは815 μ モル/リットル、非共役ビリルビンは51 μ モル/リットル、コリンエステラーゼは18 μ モル/リットル、アンモニアは96 μ モル/リットルであった。アミノトランスフェラーゼ類の量は5~10倍増加し、血液のpHは7.5であった。患者に3種の治療法を施した(連続3日)。治療時間は1日当たり約7~10時間で、以下に記載する標準系を用いた。

治療中に不利な反応は観察されなかった。血圧、酸素飽和度、血中グルコースレベル及び血液のpHは徐々にではあるが、連続的に改善された。

治療中に、患者は意識消失から回復し、2回目の治療後には脳障害の神経学的症状を残さずに完全に覚醒した(弱ばたき感も無し、完全な定位認識有り(fully orientated)、促進反応と身体的反応に遅延無し、正常な反射の回復)。次の数日間に肝臓酵素の活性が50%まで徐々に減少し、トロンボプラスチン時間は40%まで増加した。次の3日以内に血小板数が最高 130×10^9 /リットルまで増加し、また汎トロンビンIIIは4.3%になった。

表12、患者1: 治療前後の総血清ビリルビンレベル

回数	治療時間(時)	総血清ビリルビン		
		治療前	治療後	総減少
		(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
1	7	38	25.8	10.7
2	10	34.5	23.2	11.3
3	8	23.5	17.5	6.1

表13、患者1: 治療前後の非共役血清ビリルビンレベル

回数	治療時間(時)	非共役血清ビリルビン		
		治療前	治療後	総減少
		(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
1	7	3.0	2.5	0.5
2	10	3.3	2.3	1.0
3	8	1.8	1.7	0.1

*患者2、男性、34才、慢性アルコール性肝臓疾患

表15、患者2: 治療前後の血清中の尿素及びクレアチニンのレベル

回数	治療時間(時)	尿素(mg/dl)		クレアチニン	
		治療前	治療後	治療前	治療後
1	4	160	138	3.9	3.1
2	5	194	153	4.1	3.4
3	4	208	152	4.7	3.6
4	2+2	228	136	5.2	3.1
(MARS+HDF)					
5	4	202	148	4.9	3.7

*患者3、女性、29才、慢性のアルコール性肝不全

この患者はアルコール乱用の長い病歴を有し、肝硬変前段階レベルにあると臨床的に判断される公知の慢性肝不全を伴っていた。黄疸が増し、全身状態が悪化したとき入院して来た。通常の治療の下でこの患者は肝性脳障害の段階IVに進んだ。即ち、彼女は深い昏睡に落ち入り、筋の刺激に反応を示さなかった。ビリルビンレベルは29.5 $\text{mg}/100\text{ml}$ に上昇した。患者はMARS-治療の第1日に生命を脅かす重しい酸-塩基障害、脱水症、低酸素症を示し、臓腑を横んだ医師は脱死の状態で判断した。この状態において本発明による方法での治療を最終対象(ultima ratio)として開始した。その生命を脅かすひどい状態は2日以内に正常な酸-塩基値、正常酸素付加(normooxygenation)及び正常な呼吸を持つ中度の病状に完全に変化した。患者は昏睡から覚め、脳障害の段階I/IIに戻った。即ち、患者は言葉は不明瞭であったが、十分に反応した。患者を1日8時間、連続6日間治療した。この期間中にビリルビンレベルは18.2 $\text{mg}/100\text{ml}$ まで連続的に減少した。

患者(体重120kg)は6年間のアルコール性であると知られていた人で、感染(発熱、高白血球数、左シフト)の諸徴候、食欲減退及び全身状態の悪化が伴った、進行の悪い黄疸のために病院に入院することが許された。この患者を3週間保存的に治療した。保存性治療の下で全身状態が悪化し、血清ビリルビン濃度が最高37.7 $\text{mg}/100\text{ml}$ までのレベルに上昇したので、患者をMARS法で治療した。5日間の治療中に、患者の全身状態が悪化するとはなかった。4時間の治療時間はこの患者には明らかに短か過ぎた。4日目に2時間の短いMARS治療を2時間の血液ダイアフィルトレーションと組み合わせさせた。その日の非常に小さい総ビリルビンの量は、恐らくは、効果のない治療と十分な血液濾過との組み合わせ効果である。しかし、この短い治療時間でも、尿素、クレアチニン又はアンモニアのような水溶性の尿毒症毒素の分離のみならず、ビリルビンの分離も可能であった(透析液のサーキットに納められた第二透析装置に起因する)。

表14、患者2: 治療前後の総ビリルビンレベル

総血清ビリルビン				
治療回数	治療時間(時)	治療前(mg/dl)	治療後(mg/dl)	総減少(mg/dl)
1	4	37.7	32.2	5.5
2	5	37.0	28.1	7.9
3	4	32.4	27.5	4.9
4	2+2	32.8	32.1	0.7
(MARS+HDF)				
5	4	32.4	28.5	3.9

表16、患者3：MARSの4期間(1-4)との血液
ダイアフィルトレーション2期間(5-6)中の、
治療後の総血清ビリルビンレベル

回数	治療時間 (時)	総血清ビリルビン		
		治療前 (mg/dl)	治療後 (mg/dl)	総減少 (mg/dl)
1	5	23.0	24.3	4.7
2	6	23.9	19.9	7.0
3	5	23.4	17.8	5.6
4	5	18.3	13.1	5.2
5	5	15.9	12.9	3.0
6	4.5	16.5	15.6	0.9

*患者4

女性、41才、ジゴキシン中毒

この患者は頻拍性不整脈、食欲不振、嘔吐、下痢等のジゴキシン中毒の典型的な臨床徴候を示した。ECGは心室不整脈と典型的なST-変化を示した。4時間の治療後、臨床徴候は完全に正常化し、そのためECG変化を示さなくなった。

表18は治療の開始時と終点で単一のパス・クリアランス(single pass clearance)を明らかにしている。出発高毒性レベルと閉鎖ループ式(B)透析液用サーキットでのオンライン-吸着/透析によるジゴキシンの十分な再生(3.95~0.5及び2.55~0.54)が認められた。液(B)透析液用サーキットの飽和、及び吸着媒(PBS)は認められなかった。ジゴキシンは多くの組織に分布されているので、血液レベルは貧乏、他の組織からの連続インフラックスの故に、非常にゆっくり減少する。従って、より長期の治療、理想的には連続治療が望ましいだろう。

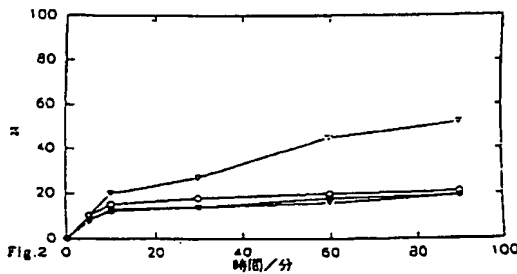
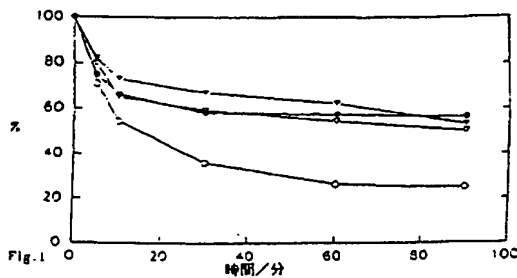
表17、患者4：4時間のMARS中のジゴキ

シンの単一パス・クリアランス

時期	場所	ジゴキシン濃度(μモル/l)	
		血清	透析液
出発時	透析装置の前	7.45	0.50
	透析装置の後	3.96	3.95
終点	透析装置の前	5.84	0.54
	透析装置の後	3.88	2.55

以上の説明は本発明を例証せんとするもので、本発明を限定するものではない。本発明の新規な着想の精神と範囲から逸脱しない限り、多数の変更及び修正を加えることができる。本明細書に記載される特定の組成物と用途に関して限定は意図されていないか、又は限定と判断すべきではないことを理解すべきである。

本発明はアルブミンに関して不透過性又は本質的に不透過性の膜に関するとしても、本発明はアルブミンに関して部分的に透過性の膜の使用をも包含するものであることを取察されるべきである。



中空、三角形-スルホプロモフタレイン
中空、円形-フェノール
充填、三角形-非共役ビリルビン
充填、円形-遊離脂防酸

総ビリルビン (mg/dl)

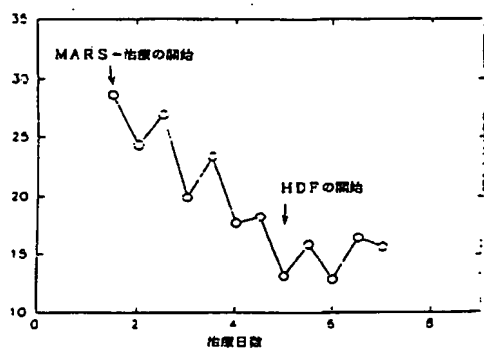
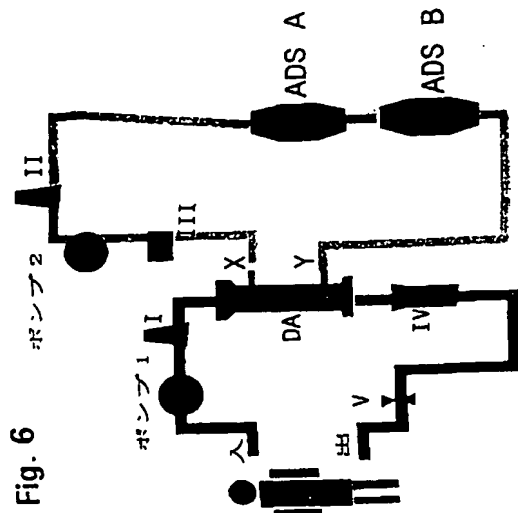
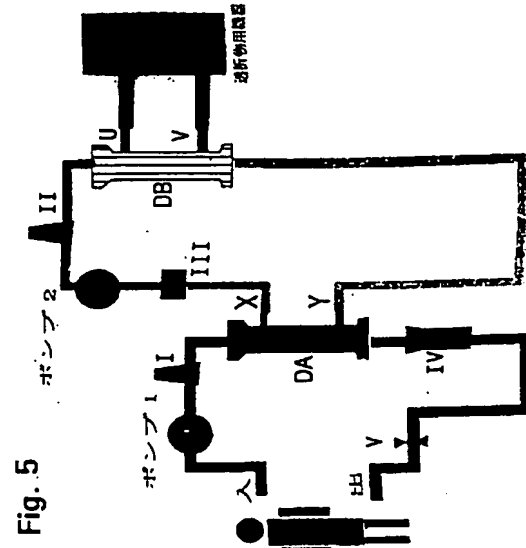
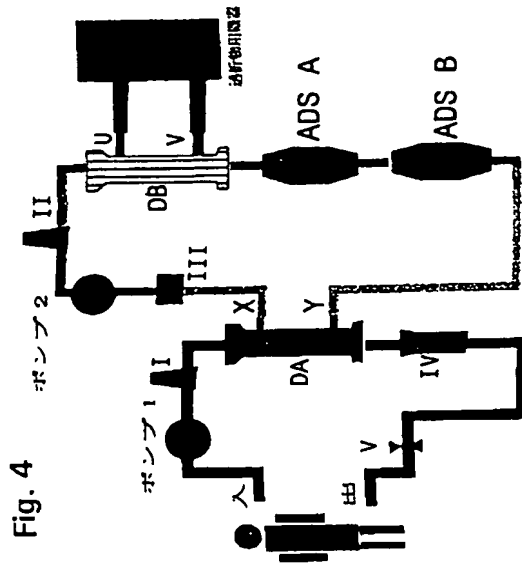


Fig. 3

[illegible]

国際調査報告				Pat. and Application No. PCT/JP 94/00073	
Patent number used as search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
EP-A-0102564	14-02-84	DE-A- 1210540	23-02-84		
		WO-A- 8402669	01-03-84		
US-A-5078885	07-01-92	NONE			
WO-A-9112072	22-08-91	US-A- 5167824	01-12-92		
		AU-B- 637884	10-06-92		
		AS-A- 7249191	03-09-91		
		EP-A- 0518666	09-12-92		
		JP-T- 5604994	01-07-93		
EP-A-0168110	19-01-88	US-A- 4741832	03-05-83		
		CA-A- 1248325	10-01-89		
		JP-C- 1581109	30-11-80		
		JP-B- 2014854	10-04-90		
		JP-A- 61031166	13-02-86		

フロントページの続き

(72)発明者 スタンゲ, ヤン
 ドイツ連邦共和国ディ — 18055 ロス
 トック, ダブリュ. ゼーレンピンデルシュ
 トラーセ 38

(72)発明者 ミッツナー, ステファン
 ドイツ連邦共和国ディ — 18055 ロス
 トック, ヴェンデンシュトラーセ 2
 (72)発明者 ラムロウ, ヴォルフガング
 ドイツ連邦共和国ディ — 18209 パッ
 ト ドベラン, ゲーテシュトラーセ 20

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.